

## ПРОБЛЕМИ БІОЛОГІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

УДК 573.6.086.83:582.284

Л.О. Антоненко, Н.А. Бісько, Н.Ю. Митропольська, І.Р. Клечак

### ГРАНИЧНІ ТЕМПЕРАТУРИ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ БАЗИДІАЛЬНИХ ГРИБІВ РОДУ *CORIOLUS* QUEL У ПОВЕРХНЕВІЙ КУЛЬТУРІ

In this paper, we define the value of high and low boundary temperatures for 33 strains of basidiomycetes mushrooms of *Coriolus*. We prove the existence of strains variability for *C. versicolor*, *C. zonatus*, *C. hirsutus* depending on a high temperature. In addition, we obtain the research results on strains viability for *C. zonatus*, *C. hirsutus* and *C. villosus* at high temperatures for the first time ever.

#### Вступ

Практичне втілення біотехнологій отримання нових біологічно активних речовин потребує розширення фундаментальних знань про біологічні властивості цінних видів лікарських базидіальних грибів. Біотехнологічно перспективними вважаються культури, що мають широкий спектр лікарських властивостей, характеризуються високими показниками росту і відсутністю токсичності. Серед найбільш цікавих представників лікарських макроміцетів — види роду *Coriolus* Quel (*Trametes* Fr.), які добре відомі у східній медицині як засоби, що зміцнюють здоров'я [1, 2]. Автори японських патентів 60-х років минулого століття пропонували як продуценти протипухлинних полісахаридів такі види цього роду: *C. hirsutus* (Fr.) Quel, *C. pubescens* (Schum. ex Fr.) Quel, *C. versicolor* (L.: Fr.) Quel, *C. zonatus* (Fr.) Quel [3–5]. До роду *Coriolus* належать багато видів, що запатентовані як продуценти онкостатичних речовин. Це базидіальні гриби *Coriolus pubescens*, *C. consors* (Berk.) Imazeki, *C. conchifer* (Schwein.) G. Cunn., *C. biformis* (Fr.) Pat. і види *C. hirsutus* та *C. versicolor*, що трапляються у флорі України.

Сучасні дослідження показали, що представники роду *Coriolus* мають антивірусні, антибактеріальні, гепатопротекторні, імуномодуючі та протипухлинні властивості [5–9]. Найкраще в клінічних умовах вивчено препарат японської біотехнологічної фірми “Sankyo” крестин, діючою основою якого є імуномодуючі протеїновмісні полісахариди гриба *Coriolus versicolor*. Цей та інші препарати полісахаридної природи з коріолуса різнобарвного широко використовуються в онкології при лікуванні раку шлунку, стравоходу, прямої кишки, яєчників, матки, простати в поєднанні з хіміо- або радіотерапією [8, 10, 11]. В Росії вже налагоджено виробництво біологічно активної добавки “Трамелан” на основі міцеліальної маси

виду *C. pubescens* [10, 11]. Види роду *Coriolus* Quel є перспективними джерелами продуцентів для промислової біотехнології, оскільки, перше, представники цього роду здатні утилізувати широкий спектр поживних речовин, що входять до складу різноманітних відходів харчової та переробної промисловості і характеризуються високою швидкістю росту в поверхневій і глибинній культурах, а по-друге, мають високий вміст біологічно активних компонентів (білків, ліпідів, полісахаридів, ферментів тощо) в міцелії та культуральній рідині.

#### Постановка задачі

Розробка технології культивування базидіомицетів роду *Coriolus* вимагає підбору умов зберігання їх штамів і встановлення верхньої та нижньої граничних температур для збереження життєздатності та росту міцелію. Отже, визначення цих показників є доцільним та актуальним і є складовою частиною розроблення нових біотехнологій культивування перспективних штамів видів роду *Coriolus*. У зв'язку з цим метою дослідження є встановлення значень граничних температур росту для штамів видів роду *Coriolus*.

#### Матеріали і методи дослідження

Об'єктами дослідження були 5 видів (33 штами) роду *Coriolus* Quel (*Trametes* Fr.), які зберігаються в Колекції шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІБК) [12]. За сучасними даними, відповідно до міжнародної бази систематики грибів CABI Bioscience та бази даних CBS Database of Fungal Names [13] всі використані в дослідженні види віднесені до роду *Trametes* Fr. В роботі було використано такі штами: *Coriolus zonatus* (Fr.) Quel (*Trametes ochracea* (Pers.) Gilbe&Ryvarden, 1897) 301, 1525, 1561, 1570, 5021, 5022, 5133, 5134, 5135, 5300, 5301, 5302,

5303; *C. versicolor* (L.: Fr.) Quel (*T. versicolor* (L.) Lloyd, 1921) 353, 1689, 5094, 5095, 5129, 5131, 5299; *C. hirsutus* (Fr.) Quel (*T. hirsuta* (Wulfen) Pilát, 1939) 338, 358, 359, 1568, 1569, 1963, 5018, 5019, 5137; *C. pubescens* (Schum.:Fr.) Quel (*T. pubescens* (Schum.) Pilát, 1939) 322; *C. villosus* (Fr.) M. Bond et S. Herrera (*T. villosa* (Sw.) Kreisel, 1971) 1009; *C. sp.* 1004, 1567.

Дослідження росту та життєздатності міцелію штамів здійснювалося при таких значеннях температури:  $4 \pm 1$ ,  $8 \pm 1$ ,  $34 \pm 1$ ,  $36 \pm 0$ ,  $37 \pm 0$ ,  $38 \pm 0$ ,  $42 \pm 1$  і  $44 \pm 1$  °C. В діапазоні від 34 до 44 °C значення досліджуваної температури змінювали із кроком 2 або 1 °C для того, щоб встановити для кожного штаму верхню граничну температуру. При температурах інкубації 4 і 8 °C тривалість культивування становила 14 діб; при температурах 34, 36, 37 °C – 7 діб; при температурах 38, 42 і 44 °C – 3 доби. Збереження чи втрата життєздатності міцелію культур перевірялись при подальшому інкубуванні за температури 28 °C. Як поживні середовища було використано агаризовані середовища: картопляно-глюкозне (КГА), сусло-агар (СА), середовище Норкранс (СН).

Для значень температури, при яких спостерігався ріст штамів, було розраховано лінійну швидкість радіального росту міцелію штаму [14] (далі – швидкість росту). Одержані кількісні результати швидкості росту були опрацьовані статистично за допомогою Microsoft Excel.

### Результати і їх обговорення

Базидіальні гриби роду *Coriolus* належать до екологічної групи дереворуйнівних (трутових) грибів. Важливим екологічним фактором, який істотно впливає на ріст і життєздатність грибів, є температура. Верхня і нижня граничні (критичні) температури інкубації для культур базидіальних грибів – це температури, при яких ріст міцелію не спостерігається, але зберігається його життєздатність і при перенесенні міцелію в більш сприятливі температурні умови його ріст відновлюється.

За результатами дослідження впливу низьких і високих температур на ріст і життєздатність міцелію штамів досліджених видів роду *Coriolus* було визначено, що при температурі 4 °C всі 33 штами не проявляли ознак росту на середовищах КГА, СА, СН, але зберігали життєздатність, про що свідчило відновлення росту

базидіоміцетів протягом двох тижнів при підвищенні температури інкубації до 28 °C.

При температурі 8 °C ріст міцелію був відсутній лише у *C. pubescens* 322 (табл. 1). У решти штамів *C. hirsutus* швидкість росту становила 0,6–1,0 мм/добу, *C. versicolor* – 1,6–2,3 мм/добу, *C. zonatus* 0,9–2,0 мм/добу.

Отже, значення нижньої граничної температури для *C. pubescens* 322 становить 8 °C, а для решти досліджених штамів – 4 °C.

Дослідження росту міцелію при температурі 34 °C дали змогу розрахувати швидкість росту для всіх досліджених штамів (табл. 1). Так, швидкість росту на КГА для штамів виду *C. hirsutus* становила 6,2–7,3 мм/добу, *C. zonatus* – 5,0–7,8 мм/добу, *C. versicolor* – 7,5–11,0 мм/добу. На діаграмі, поданій на рис. 1, показано відсотковий розподіл 31 штаму за величиною швидкості росту при 34 °C на двох середовищах – КГА і СН: для 71 % штамів на КГА швидкість росту була найвищою, а для 16 % штамів склад середовища на неї не впливав.

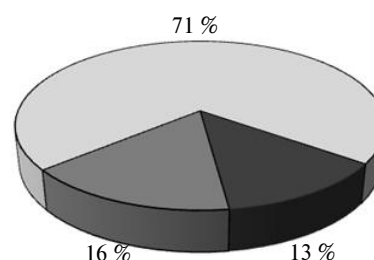


Рис. 1. Відсотковий розподіл штамів за швидкістю росту на середовищах КГА і СН при температурі 34 °C: □ – швидкість росту вища на КГА; ■ – однакова на обох середовищах; ■ – вища на СН

При температурі 37 °C ріст міцелію було відзначено для 51 % досліджених штамів (рис. 2, табл. 1). У 39 % штамів ріст був відсутній – це всі досліджені штами *C. versicolor*, *C. zonatus* 1561 і 5301, *C. pubescens* 322, *C. villosus*

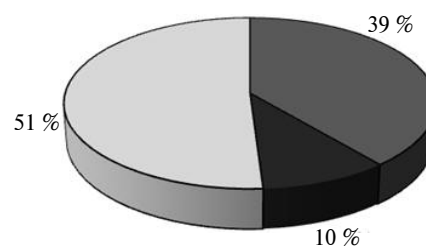


Рис. 2. Відсотковий розподіл штамів за наявністю росту на середовищах КГА і СН при 37 °C: □ – наявність росту; ■ – відсутність росту на КГА і СН; ■ – відсутність росту на одному середовищі

Таблиця 1. Швидкість росту вегетативного міцелію штамів видів роду *Coriolus* на КГА і СН при різних температурах

Вид, штам	Швидкість росту, мм/добу					
	Температура інкубації, °С					
	8		34		37	
	КГА	СН	КГА	СН	КГА	СН
<i>C. zonatus</i>						
301	1,3 ± 0,06	1,0 ± 0,05	8,3 ± 0,41	6,7 ± 0,34	0,9 ± 0,04	1,7 ± 0,07
5021	1,0 ± 0,05	0,5 ± 0,02	7,7 ± 0,38	6,6 ± 0,32	—*	1,5 ± 0,06
1525	0,9 ± 0,04	0,8 ± 0,05	8,1 ± 0,39	6,4 ± 0,32	1,1 ± 0,05	—
1561	1,0 ± 0,05	0,9 ± 0,06	8,3 ± 0,41	6,8 ± 0,35	—	—
1570	1,5 ± 0,07	1,1 ± 0,05	6,3 ± 0,31	6,0 ± 0,32	—	1,0 ± 0,05
5022	1,5 ± 0,0	0,8 ± 0,05	7,4 ± 0,35	4,6 ± 0,23	0,2 ± 0,01	1,8 ± 0,04
5133	1,1 ± 0,05	0,5 ± 0,02	7,3 ± 0,33	7,0 ± 0,30	1,5 ± 0,07	1,3 ± 0,02
5134	1,4 ± 0,06	0,7 ± 0,04	6,5 ± 0,32	6,5 ± 0,32	0,6 ± 0,03	2,0 ± 0,10
5135	0,9 ± 0,04	1,0 ± 0,04	7,1 ± 0,30	7,0 ± 0,30	0,6 ± 0,03	2,0 ± 0,10
5300	1,5 ± 0,06	0,5 ± 0,02	5,0 ± 0,25	4,3 ± 0,24	0,4 ± 0,01	2,6 ± 0,13
5301	1,5 ± 0,06	0,6 ± 0,03	8,8 ± 0,45	6,1 ± 0,32	—	—
5302	2,0 ± 0,1	0,8 ± 0,04	7,9 ± 0,38	5,8 ± 0,29	0,4 ± 0,01	1,6 ± 0,07
5303	1,3 ± 0,06	0,5 ± 0,02	7,8 ± 0,37	6,1 ± 0,32	0,4 ± 0,01	1,9 ± 0,08
<i>C. versicolor</i>						
353	1,9 ± 0,08	1,2 ± 0,05	7,5 ± 0,35	7,8 ± 0,37	—	—
1689	2,1 ± 0,10	1,2 ± 0,04	7,5 ± 0,35	7,5 ± 0,35	—	—
5094	1,6 ± 0,04	1,2 ± 0,04	10,8 ± 0,54	7,5 ± 0,35	—	—
5095	2,3 ± 0,10	1,3 ± 0,06	8,4 ± 0,41	8,0 ± 0,40	—	—
5129	1,4 ± 0,04	1,2 ± 0,06	10,3 ± 0,52	8,6 ± 0,42	—	—
5131	1,5 ± 0,02	1,5 ± 0,03	11,0 ± 0,55	9,2 ± 0,46	—	—
5299	1,7 ± 0,02	1,5 ± 0,03	10,2 ± 0,51	7,9 ± 0,36	—	—
<i>C. hirsutus</i>						
338	0,61 ± 0,01	0,67 ± 0,03	6,2 ± 0,30	5,6 ± 0,25	4,2 ± 0,21	4,7 ± 0,23
358	1,0 ± 0,04	0,61 ± 0,03	7,0 ± 0,31	7,9 ± 0,36	5,7 ± 0,24	5,0 ± 0,20
359	0,81 ± 0,03	0,68 ± 0,02	7,1 ± 0,31	6,8 ± 0,35	5,6 ± 0,23	5,3 ± 0,21
1569	0,86 ± 0,03	0,61 ± 0,02	7,3 ± 0,30	6,5 ± 0,32	6,0 ± 0,30	5,5 ± 0,24
5018	0,89 ± 0,03	0,82 ± 0,03	6,9 ± 0,36	7,3 ± 0,34	4,9 ± 0,24	4,7 ± 0,23
5019	0,60 ± 0,01	0,82 ± 0,03	7,0 ± 0,30	6,5 ± 0,32	6,1 ± 0,31	4,1 ± 0,21
5137	0,86 ± 0,01	0,62 ± 0,02	6,5 ± 0,33	6,5 ± 0,33	5,5 ± 0,24	4,8 ± 0,23
<i>C. pubescens</i> 322	—	—	4,3 ± 0,24	4,7 ± 0,25	—	—
<i>C. villosus</i> 1009	0,91 ± 0,06	0,43 ± 0,02	4,6 ± 0,28	3,5 ± 0,18	—	—
<i>C. sp.</i> 1004	0,92 ± 0,06	0,66 ± 0,02	6,0 ± 0,30	6,4 ± 0,32	4,3 ± 0,21	1,8 ± 0,06
<i>C. sp.</i> 1567	1,4 ± 0,04	1,05 ± 0,05	3,5 ± 0,18	4,4 ± 0,23	—	—

\*“—” — відсутність росту.

1009, *C. sp.* 1567. Однак міцелій цих штамів не втрачав життєздатності і відновлював ріст при 28 °С протягом тижня. Зазначимо, що склад середовища (КГА або СН) по-різному впливав на наявність росту у штамів *C. zonatus* 1525, 1570 і 5021 при температурі 37 °С (табл. 1).

Наступним етапом роботи стало дослідження росту штамів *C. versicolor*, *C. zonatus*, *C. pubescens* 322, *C. villosus* 1009 і *C. sp.* 1567 при температурах інкубації 38 і 42 °С, що дало змо-

гу зробити узагальнені висновки щодо значень верхніх граничних температур. Ці результати подані в табл. 2. Дані таблиці підтверджують існування штамової варіабельності залежно від високої температури.

Оскільки штами *C. hirsutus* мали високу швидкість росту — від 4,2 до 6,1 мм/добу при 37 °С, то було вирішено дослідити їх ріст і життєздатність міцелію при таких значеннях температури: 36, 38, 42 і 44 °С (табл. 2).

**Таблиця 2.** Значення верхніх граничних температур для росту і збереження життєздатності міцелію штамів різних видів роду *Coriolus*

Вид, штам	Температура, °C
<i>C. versicolor</i> 353, 1689, 5094, 5129	37
5095, 5131, 5299	38
<i>C. zonatus</i> 5022	37
301, 5021, 1525, 1561, 5134, 5300, 5301, 5302	38
1570, 5133, 5135, 5303	42
<i>C. pubescens</i> 322	37
<i>C. hirsutus</i> 1568, 1569	36
5137	38
338, 358, 359, 5018, 5019	44
<i>C. villosus</i> 1009	37
<i>C. sp.</i> 1567	37

Аналіз даних показав, що для штамів *C. hirsutus* 1568, 1569 і 5137 значення верхньої граничної температури становить 38 °C. Було встановлено, що для цих штамів швидкість росту при температурах 36 і 38 °C (табл. 3) була в межах 2,9–5,8 і 3,0–5,5 мм/добу відповідно.

**Таблиця 3.** Швидкість росту вегетативного міцелію *C. hirsutus* при різних значеннях температури, мм/добу

Штам	Температура інкубації, °C	
	36	38
358	2,9 ± 0,14	5,5 ± 0,16
359	4,9 ± 0,15	3,1 ± 0,11
338	5,8 ± 0,16	4,9 ± 0,12
5018	5,5 ± 0,16	5,5 ± 0,14
5019	4,4 ± 0,14	3,6 ± 0,11
5137	3,9 ± 0,13	3,3 ± 0,11

Цікаво, що для штамів *C. hirsutus* 338, 358, 359, 5018, 5019 навіть 44 °C не є критичною температурою, оскільки їхній міцелій зберігав життєздатність і відновлював ріст при температурі 28 °C.

Оскільки міцелій трутових грибів міститься зазвичай глибоко в тканинах деревини, внаслідок слабкої теплопровідності останньої, він є стійким до дії як низьких, так і високих температур [15, 16].

Деякі дослідники пов'язують стійкість базидіальних грибів до температурного стресу з

утворенням протекторних вуглеводів у цитозолі цих грибів [17, 18]. Так, при гіпотермії у вуглеводному складі цитозолу базидіоміцетів переважають арабіт і маніт, а при гіпертермії – трегалоза, інозит і сахароза.

Існують два механізми дії протекторів. Перший полягає в тому, що протектори утворюють міцні водневі зв'язки між вуглеводами і водою, не допускаючи замерзання тканинної води. Припускають, що вуглеводні компоненти можуть замінювати при зневодненні воду і таким чином стабілізувати ліпідний баланс. Другий механізм полягає в модифікації ліпідного балансу за рахунок того, що ліпіди біологічних мембран можуть повертатися зі стану гелю до рідкокристалічної будови [17–19].

Аналіз отриманих даних свідчить про те, що результати вивчення нами життєздатності штамів *C. versicolor* і *C. pubescens* при високих температурах, а також наявність штамової варіабельності залежно від них збігаються з літературними [8, 14, 19, 20].

Результати щодо життєздатності штамів *Coriolus zonatus*, *C. hirsutus* і *C. villosus* при високих температурах отримано вперше.

## Висновки

Для видів *C. versicolor*, *C. zonatus* і *C. hirsutus* підтверджено існування штамової варіабельності залежно від високих граничних температур.

Значення нижньої граничної температури для *C. pubescens* 322 становить 8 °C, а для решти досліджених штамів видів *C. versicolor*, *C. zonatus* і *C. hirsutus* – 4 °C.

Значення гранично високої температури для штамів *C. versicolor* 353, 1689, 5094, 5129, *C. zonatus* 5022, *C. pubescens* 322, *C. villosus* 1009 і *C. sp.* 1567 становить 37 °C; для *C. versicolor* 5095, 5131, 5299, *C. zonatus* 301, 5021, 1525, 1561, 5134, 5300, 5301, 5302, *C. hirsutus* 1568, 1569 і 5137 – 38 °C; для *C. zonatus* 1570, 5133, 5135, 5303 – 42 °C.

Температура інкубування 44 °C не була критичною для штамів *C. hirsutus* 338, 358, 359, 5018, 5019. Вони зберігали життєздатність при цій температурі, що свідчить про наявність у них потужних термозахисних систем.

У подальших дослідженнях планується вивчити життєздатність і ріст штамів *C. hirsutus* 338, 358, 359, 5018, 5019 при значеннях температури вище 44 °C.

1. *Stamets P.* Growing Gourmet and Medicinal Mushroom. — Berkeley Toronto: Ten Speed Press, 2000. — 574 p.
2. *Денисова Н.П.* Лечебные свойства грибов. Этномикологический очерк. — СПб.: Изд-во СПбГМУ, 1998. — 60 с.
3. *Белова Н.В.* Базидиомицеты — источники биологически активных веществ // Растительные ресурсы. — 1991. — Вып. 2. — С. 8–15.
4. *Белова Н.В.* Перспективы использования биологически активных соединений высших базидиомицетов в культуре // Микология и фитопатология. — 2004. — 38, вып. 2. — С. 1–5.
5. *Белова Н.В., Ефремова И.Я.* Препараты из высших базидиальных грибов — объект патентно-правовой охраны // Там же. — 1992. — 26, вып. 4. — С. 321–324.
6. *Бухало А.С., Соломко Е.Ф., Митропольська Н.Ю.* Базидіальні макроміцети з лікарськими властивостями // Укр. ботан. журн. — 1996. — 53, № 3. — С. 192–201.
7. *Горшина Е.С.* Морфологические и физиолого-биохимические особенности грибов рода *Coriolus*, продуцентов биологически активных веществ // Современная микология в России. Первый съезд микологов России: Тезисы докл. — М.: Нац. академия микологии, 2002. — С. 253–254.
8. *Горшина Е.С.* Глубинное культивирование грибов рода *Trametes* Fr. с целью получения биологически активной биомассы: Дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.23, 03.00.24. — М., 2003. — 250 с.
9. *Трутнива І.А., Горова Т.Л., Дудченко Л.Г.* Вищі базидіальні гриби — об'єкт медичних досліджень. Імуномодуюча активність // Фітотерапія. — 2003. — № 1-2. — С. 32–35.
10. *Горшина Е.С.* Биотехнологические препараты лекарственных грибов рода *Trametes* // Успехи мед. микологии; Под общ. ред. Ю.В. Сергеева. — М.: Нац. академия микологии, 2005. — V. — С. 246–249.
11. *Горшина Е.С., Скворцова М.М.* Трамелан — отечественная биологически активная добавка на основе сухой биомассы лекарственного базидиомицета *Trametes pubescens* (Schumach.) и другие препараты грибов рода *Trametes* (Coriolus) // Там же. — С. 262–266.
12. *Каталог культур* Колекції шапинкових грибів (ІБК) / А.С. Бухало, Н.Ю. Митропольська, О.Б. Михайлова. — К.: Ін-т ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, НВФ “Славутич-дельфін”, 2006. — 36 с.
13. *База даних CBS Database of Fungal Names.* — <http://www.indexfungorum.org/>
14. *Соломко Е.Ф., Ломберг М.Л., Митропольська Н.Ю., Чоловська О.В.* Ріст окремих видів лікарських макроміцетів на поживних середовищах різного складу // Укр. ботан. журн. — 2000. — 57, № 2. — С. 119–126.
15. *Бондарцев А.С.* Трутовые грибы Европейской части СССР и Кавказа. — Ленинград: Изд-во АН СССР, Москва, 1953. — 1106 с.
16. *Рипачек В.* Биология дереворазрушающих грибов. — М.: Лесная промышленность, 1967. — 276 с.
17. *Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С.* Протекторные углеводы цитозоля базидиальных грибов // Матер. юбилейной конф., посвященной 100-летию со дня рождения М.В. Горленко “Высшие базидиальные грибы: индивидуумы, популяции, сообщества”. — М.: ООО “Издательство “Восток–Запад”, 2008. — С. 56–63.
18. *Феофилова Е.П., Терешина В.М., Горнова И.Б.* Изменение в углеводном составе клеток грибов в связи с адаптацией к температурному стрессу // Микробиология. — 1994. — 63, № 5. — С. 792–796.
19. *Govrishanka J.* Components and cellular mechanisms of adaptation to biological water stress // Biology International. — 2001. — N 46. — P. 8–11.
20. *Бисько Н.А., Бухало А.С., Вассер С.П. и др.* Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубокой культуре / Под ред. И.А. Дудка. — К.: Наук. думка, 1983. — 312 с.
21. *Ганбаров Х.Г.* Эколого-физиологические особенности дереворазрушающих высших базидиальных грибов. — Баку: Элм, 1989. — 200 с.